

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/01</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/14213</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01227</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月12日(12.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/249392 1998年9月3日(03.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 三品昌美(MISHINA, Masayoshi)[JP/JP] 〒135-0044 東京都江東区木場3-11-5-503 Tokyo, (JP) 安藤秀樹(ANDO, Hideki)[JP/JP] 〒113-0023 東京都文京区向丘1-10-6-203 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, US</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: <b>HIGHLY EFFICIENT MUTAGENESIS METHOD WITH THE USE OF PSORALEN DERIVATIVES</b></p> <p>(54) 発明の名称 ソラレン誘導体による高効率変異法</p> <p>(57) Abstract A method for mutating genes of vertebrates, preferably zebrafish, by using psoralen derivatives, preferably trimethylpsoralen; and a method for constructing genes mutated by the above method. A method for analyzing functions of a vertebrate gene which comprises mutating a pyrimidine base-containing part of the gene by using a psoralen derivative, expressing the mutated gene and examining the correlation thereof.</p>		

(57)要約

本発明は、ソラレン誘導体、好ましくはトリメチルソラレンを用いて脊椎動物、好ましくはゼブラフィッシュの遺伝子を変異させる方法、及び、その方法により変異した遺伝子を製造する方法に関する。

また、本発明は、ソラレン誘導体を用いて遺伝子のピリミジン塩基を含有する部分に変異を生じさせ、当該変異遺伝子を発現させてその相関により、脊椎動物の遺伝子の機能を解析する方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦  
AL アルバニア  
AM アルメニア  
AT オーストリア  
AU オーストラリア  
AZ アゼルバイジャン  
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
BS バルルース  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コートジボアール  
CM カメルーン  
CN 中国  
CR コスタ・リカ  
CU キューバ  
CY キプロス  
CZ チェッコ  
DE ドイツ  
DK デンマーク

DM ドミニカ  
EE エストニア  
FI フィンランド  
FR フランス  
GB 英国  
GD グレナダ  
GE ジョージア  
GH ガーナ  
GN ギニア  
GW ギニア・ビサウ  
GR ギリシャ  
HU ハンガリー  
ID インドネシア  
IE アイルランド  
IL イスラエル  
IN インド  
IS アイスランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KE ケニア  
KG キルギスタン  
KP 北朝鮮  
KR 韓国

KZ カザフスタン  
LC セントルシア  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリ・ランカ  
LR リベリア  
LS レソト  
LT リトアニア  
LV ルクセンブルグ  
MA モロッコ  
MC モナコ  
MD モルドヴァ  
MG マダガスカル  
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア  
共和国  
ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
MX メキシコ  
NE ニジェール  
NL オランダ  
NO ノールウェー  
NZ ニュー・ジーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア

RU ロシア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SG シンガポール  
SI スロヴェニア  
SK スロヴァキア  
SL シエラ・レオネ  
SN セネガル  
SZ スワジランド  
TD チャード  
TG トーゴ  
TJ タジキスタン  
TZ タンザニア  
TM トルクメニスタン  
TR トルコ  
TT トリニダード・トバゴ  
UA ウクライナ  
UG ウガンダ  
US 米国  
UZ ウズベキスタン  
VN ヴェトナム  
YU ユーゴスラヴィア  
ZA 南アフリカ共和国  
ZW ジンバブエ

## 明 細 書

## ソラレン誘導体による高効率変異法

技術分野

本発明は、ソラレン誘導体、好ましくはトリメチルソラレンを用いて脊椎動物、好ましくはゼブラフィッシュの遺伝子を変異させる方法、その方法により変異させられた遺伝子を製造する方法、及び、その方法を用いて脊椎動物の遺伝子の機能を解析する方法に関する。

背景技術

最近数年の間に、脊椎動物の発生機構に関与する因子を網羅的に単離しようと、ドイツ、アメリカが中心となってゼブラフィッシュ (Zebrafish) を使った大規模なミュータントスクリーニングが行われ、発生に関わる数百の遺伝子が報告された (Driever, W. *et al.*, (1996) *Development* 123, 37-46.; Haffter, P. *et al.*, (1996) *Development* 123, 1-36.)。

このプロジェクトに使用された変異原 (ミュータントの変異誘発をもたらす物質) は、N-エチル-N-ニトロソ尿素 (ENU) で、これは遺伝子を構成する1個の塩基を別の1塩基に置き換える作用を持つ。従って、その効率の高さというメリットと同時に、その微細な変異を手がかりに目的の変異遺伝子を同定しクローニングすることが難しいという欠点も併せ持っている (Postlethwait, J. H. and Talbot, W. S. (1997) *Trends Genet.*, 13, )。

一方で、遺伝子クローン化指向型の手法として、ホプキンス (Hopkins) のグループはレトロウイルスベクターを染色体に挿入させて遺伝子を破壊するという、エレガントな挿入変異法を開発した (Gaiano, N. *et al.*, (1996) *Nature* 383, 829-832.)。挿入されたベクターはその配列が既知であるためそれを指標にベクター周辺の染色体領域も同時に回収できた。しかし、その効率は少なくともENUの数十倍低く、網羅的規模の変異作成には適さなかった (Postlethwait, J. H. and Talbot, W. S. (1997) *Trends Genet.*, 13, )。

他のひとつのアプローチとして、染色体欠失変異法が挙げられる。このアプローチによる欠失は、それ自体が変異遺伝子をクローン化するための目印となるという長所を有している。リプレゼンティショナル ディファレンス アナリシス (RDA: Representational Difference Analysis) (Cimino, G. D., Gamper, H. B., Isaacs, S. T. and Hearst, J. E. (1985) Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1151-1193.) などの方法によるアプローチで、それは威力を発揮する。これまでにも、ガンマ線やX線照射が染色体欠失を引き起こすことは知られていた。しかし、それらの誘発する欠失は大きく、また染色体の破壊を伴うものなので、単一の遺伝子座といったレベルでの変異の単離は難しく、それらの方法ではゼブラフィッシュの染色体に大きな欠失や破壊をもたらし、詳細な変異の研究するためには適当ではなかった (Chackrabarti, S. *et al.*, (1983) *Genetics* 103, 109-124.; Mullins, M. C. *et al.*, (1994) *Curr. Biol.* 4, 189-202.)。

また、遺伝子の変異による発生機構の解明は、発生因子の単離や同定のみならず、脳などの各器官の発生と機能及びそれらに関与する遺伝子の機能を知る上で、強力な遺伝学なアプローチとなると考えられている。とくに脊椎動物における体系的な遺伝学的な解析が非常に重要になってきている。ゼブラフィッシュは脊椎動物のなかでも多くの長所をもち、その脳などの器官の発生は成長する透明な胚の中で急速に進んでいくのが観察できるからである (Stuemer, C. A. O. (1988) *Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo. J. Neurosci.* 8, 4513-4530.)。

一方、DNAの架橋試薬として知られているトリメチルソラレン (4, 5', 8-trimethylpsoralen) (以下、TMPと省略する。) が、大腸菌 (*Escherichia coli*) や線虫 (*Caenorhabditis elegans*) において高頻度で小さな染色体欠失を引き起こすことが知られていた。

そこで、脊椎動物、特にゼブラフィッシュにおける、高頻度かつクローニング可能な新しい遺伝子変異系 (mutagenesis system) の開発が求められていた。

本発明者らは、特定遺伝子座の変異頻度測定と試験的スクリーニングの結果、TMPにより脊椎動物においても変異が生起することを確認し、TMPによる変異法が効率的であることを確認した。更に、実際にTMP変異法が機能していることを確かめるため、本発明者らは本法でとられた神経系に特異的な異常をもつ変異体を解析し、これらの結果から、TMP変異法が脊椎動物、特にゼブラフィッシュの変異体を単離し分子レベルで解析するための効果的方法であることを見出して本発明を完成した。

### 発明の開示

本発明は、ソラレン誘導体、好ましくはトリメチルソラレンを用いて脊椎動物、好ましくはゼブラフィッシュの遺伝子を変異させる方法、及び、その方法により変異した遺伝子を製造する方法に関する。

また、本発明は、ソラレン誘導体を用いて遺伝子のピリミジン塩基を含有する部分に変異を生じさせ、当該変異遺伝子を発現させてその相関により、脊椎動物の遺伝子の機能を解析する方法に関する。

### 図面の簡単な説明

第1図は、TMP変異法の模式図を示す。

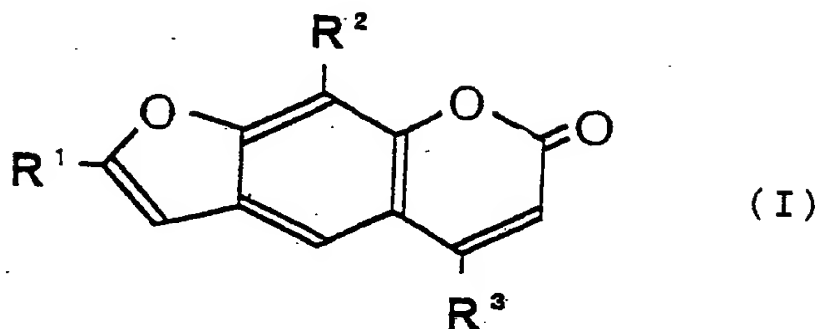
第2図は、野生型(A)と $ntrn$ (B)胚の発生38時間での抗アセチル化チューブリン抗体による予定視蓋神経の免疫染色の側方からの図面に代わる写真である。

第3図は、発生28時間の三叉神経節感覚神経(A、B)、Rohon-Beard感覚神経(C、D)、そして後方一次運動神経(E、F)の野生型(A、C、E)および $edw$ (B、D、F)胚の側方からの左側頭部先端の図面に代わる写真である。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明のソラレン誘導体は、紫外線やX線などの照射によりDNAなどの核酸に架橋を生じさせる機能を有し、その後当該架橋部分を包含する部分を欠失させ

ることができる機能を有するものであればソラレン自体でもその誘導体であってもよいが、好ましくは次式 (I)、



(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ は、それぞれ独立に、水素原子又は炭化水素基を示す。) で表される化合物が挙げられる。

前記一般式 (I) における炭化水素基としては、例えば、炭素数 1～30、好ましくは 1～20、より好ましくは 1～10 の直鎖状又は分枝状のアルキル基、より好ましくは低級アルキル基であり、炭素数 2～30、好ましくは 2～20、より好ましくは 2～10 の直鎖状又は分枝状のアルケニル基、炭素数 5～30、好ましくは 5～20、より好ましくは 6～10 の単環、多環又は縮合環式のシクロアルキル基、炭素数 6～30、好ましくは 6～20、より好ましくは 6～10 の単環、多環又は縮合環式のアリール基などが挙げられる。

一般式 (I) 中の前記したアルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基などは、さらに置換基を有するものであってもよく、また、これらの基が相互に置換したものであってもよい。例えば、アルキル置換シクロアルキル基、アルキル置換アリール基、アリール置換アルキル基 (アラルキル基)、シクロアルキルアルキル基などが挙げられる。

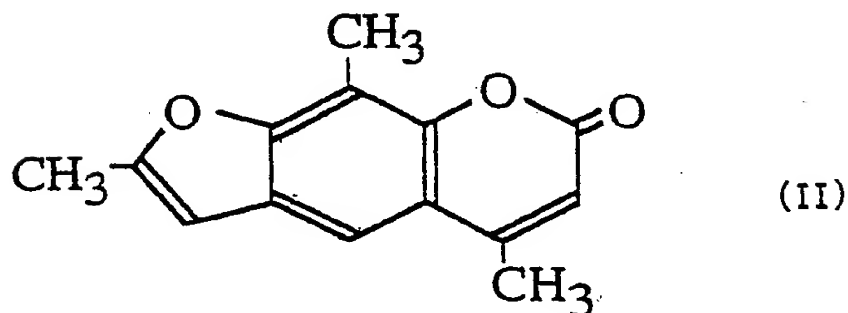
その他の置換基としては、前記したアルキル基からなるアルコキシ基、アルキルチオ基、ジアルキルアミノ基、トリアルキルシリル基などの他に、塩素、臭素、フッ素などのハロゲン原子、メチレンジオキシ、2, 2-ジメチルメチレンジオキシ基などのアルキレンジオキシ基、シアノ基などが挙げられる。



好ましい置換基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*t*-ブチル基などの低級アルキル基、フェニル基、ナフチル基などのアリール基、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基などの低級アルコキシ基、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基などのジ低級アルキルアミノ基、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、ジメチルエチルシリル基、ジメチル*t*-ブチルシリル基などの低級アルキル置換シリル基、塩素、フッ素などのハロゲン原子、メチレンジオキシ、2, 2-ジメチルメチレンジオキシ基などのアルキレンジオキシ基、シアノ基などが挙げられる。

一般式 (I) の  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*t*-ブチル基、ヘキシル基などの低級アルキル基、ビニル基、プロベニル基、ブテニル基などの低級アルケニル基、シクロヘキシル基、シクロペンチル基などのシクロアルキル基、フェニル基、ナフチル基などのアリール基、ベンジル基、フェネチル基などのアラルキル基等が挙げられる。

本発明における好ましいソラレン誘導体としては、次式 (II)、



で表されるトリメチルソラレン (TMP) が挙げられる。

TMP (4-5'-8-trimethylpsoralen) は、紫外線照射により DNA 二重らせんを構成するピリミジン塩基と共有結合し、DNA 二重鎖の間を架橋する。架橋された部分の周辺は生物本来の DNA 組み換え修復機構

により切り出され、結果として小規模な欠失を生ずる (Cimino, G. D. *et al.*, (1985) *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 1151-1193.)。

欠失部に必須遺伝子が存在した場合、その機能が失われミュータントが現われる。ENUの点突然変異と異なり、染色体レベルの欠失という目印が付加されるので、特定の方法、例えば、RDA法 (Representational Difference Analysis) (Lisitsyn, N. *et al.*, (1993), *Science*, 259, 946-951.)などで、変異部位近傍の染色体断片をクローニングした後、欠失部を求めて染色体上を検索 (Chromosomal walking) することにより変異遺伝子を同定し、クローニングすることが可能となる。

本発明者らが行ったパイロットスクリーニングの結果、ソラレン誘導体、特にTMPを用いた遺伝子変異法においては、ENUと同程度のミュータント単離頻度を示すことがわかった。

TMPを用いた遺伝子変異法は、過去にカエノラブディティスエレガンス (*Caenorhabditis elegans*) で報告されている (Yandell, M. D. *et al.*, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1381-1385.)。しかし、脊椎動物の遺伝子、特に脊椎動物の精子をTMPで処理し、人工受精で胚に変異を導入する本法は、過去に例がない新規な方法論である。この方法により、ゼブラフィッシュの網羅的な変異株の単離ばかりか、それらの変異遺伝子のクローニングによって、脊椎動物の全ての機能解析を分子レベルで行うことを可能にする意味で大きな独自性を持っている。

ゼブラフィッシュの効率的な欠失変異法を開発するために、本発明者らはDNA架橋試薬であるTMP (Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C. F., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y. R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J. and Boggs, C. (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37-46.) による実験を行った。第1図にこの実験方法の概要を示す。第1図を簡単に説明する。AB系統の雄から採取された精子を、TMP溶液内においた後、紫外線照射された。処理後の精子は野生型の卵と人工受精され、

変異処理されたゲノムをヘテロ (+/m) にもつ F 1 個体に育てられた。F 1 個体は野生型 A B 系統 (+/+) と交配され、その半数が特定の変異遺伝子座をヘテロにもつ F 2 集団を生みだした。F 2 子孫 (+/+または+/m) 同士の交配ペアの 4 組に 1 組の割合で、F 3 に 1/4 の比率で変異をホモ接合 (m/m) に持ち、変異体の表現型を発現する胚 (白色の胚) を生み出すペアができる。

ゼブラフィッシュ A B 系統の雄を、0.03% (W/V) の 3-アミノ安息香酸エチルエステルで麻酔し、スポンジブロックのスリットの間にはさみ込んだ。3~5 尾の雄から 20  $\mu$ l 用のキャピラリーで精液を吸引し、3 ng/ml から 300 ng/ml の TMP と、1% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含むハンク (Hank's) 食塩水 100  $\mu$ l に懸濁した。5 分間氷の上で静置した後、その懸濁液 10  $\mu$ l ずつを厚さ 2 ミリメートルのプラスチック製ペトリ皿の上に滴下して並べ、DNA 架橋器 (TFL-20M、Vilber Lourmat 社製、フランス) の紫外線照射装置の上に置き、波長 312 nm、0.02 J/cm<sup>2</sup> の条件でペトリ皿の底越しに紫外線を照射した。

変異誘発処理された精液を、A B 系統の雌を麻酔して定法 (Stuemer, C. A. O. (1988) Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo. J. Neurosci. 8, 4513-4530.) に沿って腹を弱く押して絞り出した新しい正常卵と人工受精した (第 0 日)。受精した卵を暗黒下で 28 度にて 12 時間置き、定法通り (Allende, M. L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N. and Hopkins, N., (1996) Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development. Gene Dev. 10, 3141-3155.) F 1 個体に育てた。

TMP を添加していない他は同じ条件で処理されたものは、ほとんど全ての胚が成魚に育った (594 例中、580 例)。一方、30 ng/ml TMP で処理されたものは 9 日目までにわずか 57% (650 例中、371 例)、300 ng/ml TMP で処理されたものでは 9.5% (515 例中、49 例) しか生き延びなかった。

30 ng/ml TMP で処理された精子から発生した胚の内、70% 以上 (1

70例中、122例)が受精後2日目までにさまざまな奇形を示した。

一方で、TMPと紫外線両方または一方の処理をなくした条件では、奇形の個体はわずか(2%以下)であった。

次に、特定の遺伝子座の変異頻度を測定することでTMP変異作成法の効率を調べるために、点々模様のゼブラフィッシュを用いてテスター変異についての実験を行った。テスター変異に用いた点々模様の形質は劣性で、単一遺伝子座由来であることを示すメンデル様式の遺伝をした。本発明者らは、AB系統の雄の精子を、30 ng/mlと300 ng/mlのTMPでそれぞれ処理し、テスター系統の雌の卵を人工受精した。30日後、30 ng/mlのTMPでの処理由来のF1個体、1181例中6例が、また300 ng/mlのTMPでの処理由来のF1個体、130例中3例が点々模様の色素変異を示した。なお、紫外線照射のみで処理したF1では866例の中に色素変異を持った個体はゼロであった。その結果、変異頻度は、30 ng/mlのTMPで0.5%、300 ng/mlのTMPで2%と計算され、TMP変異法はゼブラフィッシュに極めて有効であることが示された。

受精後1日から5日の間で、F3の胚に実体顕微鏡観察による形態と、接触刺激に対する応答によるスクリーニング(F2スクリーン、第1図参照)を行ったところ、主に30 ng/mlのTMPで処理された精子由来のF1、26個体から10系統の変異体を単離した。さらにF1個体の卵を機能不能の精子で活性化させて単異発生させた半数体のスクリーン(Stuemer, C. A. O. (1988) Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebra fish embryo. J. Neurosci. 8, 4513-4530.)からも2系統単離した。得られた変異系統の内訳は次のとおりである。発育縮退(4系統)、小頭小眼(3系統)、不動(2系統)、心室拡張をともなう浮腫(1系統)、短身(1系統)、および視蓋壊死(1系統)。全ての変異体は劣性致死であり、メンデル様式の遺伝を示した。

TMPによる変異法が十分に機能していることを確かめるため、本発明者らは神経系に異常を持つ2系統の変異体(j5とj10)をさらに詳しく解析した。無視蓋神経系(no tectal neuron) (ntnj5)変異体の胚の場合、だいたい

40時間周辺で視蓋と眼に選択的に濁りが生じた。抗アセチル化チューブリンモノクローナル抗体 (Sigma社) (Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J. M., Jiang, Y.-J., Heisenberg, C.-P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C. and Nüsslein-Volhard, C. (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. Development 123, 1-36.) で染色したところ、野生型の胚では37~39時間の間に著しく予定視蓋神経の軸索形成が進み、視蓋ニューロビルを形成した (第2図A)。しかし、無視蓋神経系 (ntn) 変異体の胚では他の部位では染色に違いは見られなかったが、予定視蓋の神経は同じ時期にほとんど発生が起こっていなかった (第2図B)。これらの解析の結果は、ntnの変異は視蓋神経と眼の発生に影響を与えることを示す。ntn変異体は、これまでに報告されたいくつかの神経発生異常変異体 (クラスIとIII) と、視蓋・眼が侵される点で共通している (Chen, C. and Tonegawa, S. (1997) Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning and memory in the mammalian brain. Annu. Rev. Neurosci. 20, 157-184, Chackrabarti, S., Streisinger, G., Singer, F. and Walker, C. (1983) Frequency of  $\gamma$ -ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Genetics 103, 109-124.)。

第2図は、野生型 (A) と無視蓋神経系 (ntn) (B) の胚の発生38時間での抗アセチル化チューブリン抗体による予定視蓋神経の免疫染色を示したものである。側方からのカラー写真である。左側頭部先端。矢印は、TPC (The tracts of posterior commissures) を指す。「T」は、予定視蓋を示す。第2図中のスケールバーは、100  $\mu$ mを示す。

また、本発明者らは、枝分かれ (edawakare) (edwj10) 変異体を頭が小さく体の動かない変異体として見つけた。24時間周辺での尻尾への軽い接触に反応しない特徴と一致して、この変異体で最初にみつかった異常は感覚神経と筋肉であった。枝分かれ (edw) 変異体では、発生20時間で、三叉

神経節とローンビード (Rohon-Beard) 感覚神経の末梢軸索の異常な進展がみられた。野生型では、発生 28 時間で三叉神経節細胞の末梢軸索は頭部後半の表皮と卵黄腔前半に投射していた (第 3 図 A) が、変異体ではもっと広範に投射し、頭部前半まで達していた。また、軸索は細かった (第 3 図 B)。

発生 28 時間で、野生型のローンビード (Rohon-Beard) 神経はその末梢軸索を体側全体にほぼ腹側かつ尻尾側に向けて伸びていた (第 3 図 C) が、変異体ではさかんに分岐しさまざまな方向に伸びていた (第 3 図 D)。発生 20 時間で、野生型の形成途中の筋繊維は部分的に縞模様を現わしたが、変異体はまったく現わさなかった。枝分かれ (edw) 変異体では、野生型の骨格筋ははっきりと縞状構造を形成する 36 時間になっても変化はなかった。

本発明者らはさらに、発生 28 時間で変異体の後方一次運動神経 (CaP) が異常であることを発見した。野生型では、CaP 軸索は腹側筋節まで伸びるが (第 3 図 E)、枝分かれ (edw) 変異体の前方 15 個の筋節の CaP 軸索の殆どは筋節の中ほどで伸長をやめていた (第 3 図 F)。

第 3 図は、発生 28 時間の三叉神経節感覚神経 (A 及び B)、ローンビード (Rohon-Beard) 感覚神経 (C 及び D)、そして、後方一次運動神経 (E 及び F) の、野生型 (A、C 及び E) および枝分かれ型 (edw) (B、D 及び F) の胚の左側頭部先端の側方からのカラー写真である。第 3 図の矢印の頭は、edw 胚の抗進した感覚神経軸索 (B 及び D) と、縮退した運動神経軸索 (F) である。第 3 図のスケールバーは、100  $\mu$ m (A 及び E)、50  $\mu$ m (C) である。

ここで述べたすべての形質は、解析したすべての edw 変異体で再現してみられた。これらの結果は、edw 変異が三叉神経節およびローンビード (Rohon-Beard) 感覚神経の投射のみならず体壁筋繊維の形成にも影響を及ぼすことを示唆する。

また、CaP 軸索の縮退は体壁筋の異常のせいであるとも考えられる。これまでに数種の筋肉縞状構造ができない不動な変異体 (fub, fro, slo) が報告されている (Gaiano, N., Amsterdam, A., Kawakami, K., Allende, M., Be

cker, T. and Hopkins, N. (1996) Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. Nature (London) 383, 829-832、Sladek, F. M., Melian, A. and Howard-Flanders, P. (1989) Incision by UvrABC excinuclease is a step in the path to mutagenesis by psoralen crosslinks in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3982-3986.)。しかし、感覚神経の異常についての報告はない。

本発明者らは、DNA架橋試薬ソラレン誘導体を使って、脊椎動物であるゼブラフィッシュの高効率変異法の手法を開発した。特定遺伝子座の変異頻度や試験的スクリーニングで示されたソラレン誘導体による変異法の高い効率は、小規模であっても大量の数のゼブラフィッシュ変異体を単離することを可能にするだろう。

30 ng/ml というソラレン誘導体の濃度はおそらく強すぎる。なぜなら、TMP による実験においても、多くの F1 胚がおそらく優性致死変異を持っているため奇形を呈したからである。実際には、3 ng/ml の濃度のソラレン誘導体でも変異体の単離は効率的であった。

したがって、本発明の方法において使用されるソラレン誘導体、好ましくは TMP の濃度は、0.01~300 ng/ml、好ましくは 0.1~100 ng/ml、より好ましくは 0.1~50 ng/ml、さらに好ましくは 1~30 ng/ml である。

また、本発明の方法におけるソラレン誘導体の投与方法としては、前述したように精子に処理することもできるが、他の方法であってもよい。

本発明の方法においては、ソラレン誘導体で被検体を処理した後、紫外線、X線、ガンマ線などの高エネルギー線を照射する。これらの高エネルギー線は、被検体の種類やソラレン誘導体の種類や処理量などにより、適宜選択することができる。

本発明における脊椎動物は、ヒトを除く脊椎動物であって、例えば、魚類、哺乳類などが挙げられる。

本発明の変異法の最も重要な特長は、ソラレン誘導体、特にTMPの作用の特性にある。紫外線照射によるTMPなどの活性化は、DNA二重らせん構造のピリミジン塩基との共有結合をもたらし、DNAに架橋を形成する (Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S.C. F., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y. R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J. and Boggs, C. (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37-46.)。DNA二本鎖の間の架橋部分の塩基切り出しと組み換え修復はしばしばゲノムDNAの小規模な欠失をもたらし、ことが大腸菌と線虫で知られている (Chitnis, A. B. and Kuwada, J. Y. (1990) Axonogenesis in the brain of zebrafish embryos. *J. Neurosci.* 10, 1892-1905、Furutani-Seiki, M., Jiang, Y.-J., Brand, M., Heisenberg, C.-P., Houart, C., Beuchle, D., van Eeden, F. J. M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J. and Nusslein-Volhard, C., (1996) Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 229-239.)。そのような欠失は適切な方法の適用により変異遺伝子のクローン化に必要な指標となりうる。

実際に、我々は同腹から生まれた変異体と正常個体のゼブラフィッシュの間でRDA (Representational Difference Analysis) (Cimino, G. D., Gamper, H. B., Isaacs, S. T. and Hearst, J. E. (1985) Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1151-1193.)を行い、*edw*変異体のゲノムに欠失しているDNA断片をクローン化することができた。

従って、本発明の変異法はゼブラフィッシュ変異体を単離し分子レベルで解析するために、ENU変異法 (Russell, W. L., Kelly, E. M., Hunsicker, P. E., Bangham, J. W., Maddux, S.C. and Phipps, E. L. (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5818-5819、Wilson, S. W., Ross, L. S., Parrett, T. and Easter, S. S. Jr. (1990) The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*



rio. Development 108, 121-145.) や挿入変異法 (Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Haffter, P. and Nüsslein-Volhard, C. (1994) Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. Curr. Biol. 4, 189-202.) に加えて価値あるアプローチの仕方になる。

### 実施例

本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

ゼブラフィッシュ AB 系統の雄を、0.03% (W/V) の 3-アミノ安息香酸エチルエステルで麻酔し、スポンジブロックのスリットの上に仰向けにはさみ込んだ。3~5尾の雄から 20  $\mu$ l 用のキャピラリーで精液を吸引し、3 ng/ml から 300 ng/ml の TMP と 1% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含むハンク (Hank's) 食塩水 100  $\mu$ l に懸濁した。

5 分間氷の上で静置した後、懸濁液 10  $\mu$ l ずつを厚さ 2 ミリメートルのプラスチック製ペトリ皿の上に滴下して並べ、DNA 架橋器 (TFL-20M、Vilber Lourmat 社製、フランス) の紫外線照射装置の上に置き、波長 312 nm、0.02 J/cm<sup>2</sup> の条件でペトリ皿の底越しに紫外線を照射した。

変異誘発処理された精液を AB 系統の雌を麻酔して定法に沿って腹を弱く押して絞り出した新しい正常卵と人工受精した (第 0 日)。受精した卵を暗黒下で 28 °C にて、12 時間置き、定法通り F1 個体に育てた。

その結果、30 ng/ml の TMP で処理されたものは 9 日目までにわずか 57% (650 例中、371 例)、300 ng/ml の TMP で処理されたものでは、9.5% (515 例中、49 例) しか生き延びなかった。

30 ng/ml の TMP で処理された精子から発生した胚の内、70% 以上 (170 例中、122 例) が受精後 2 日目までにさまざまな奇形を示した。

## 比較例 1

TMPを添加しない他は同じ条件で、実施例 1 と同様に処理した。その結果、ほとんど全ての胚が成魚に育った（594 例中、580 例）。

また、TMPと紫外線両方または一方の処理をなくした条件では、奇形の個体はわずか（2%以下）であった。

## 実施例 2

点々模様のゼブラフィッシュを用いて実施例 1 と同様に処理してテスター変異を行った。

AB系統の雄の精子を、30 ng/mlと300 ng/mlのTMPでそれぞれ処理し、テスター系統の雌の卵を人工受精した。30日後、30 ng/mlのTMP処理由来のF1個体1181例中6例が、また、300 ng/mlのTMP処理由来のF1個体130例中3例が点々模様の色素変異を示した。

なお、紫外線照射のみで処理したF1では、866例の中に色素変異を持った個体はゼロであった。その結果、変異頻度は、30 ng/ml TMPで0.5%、300 ng/ml TMPで2%と計算され、TMP変異法はゼブラフィッシュに極めて有効であることが示された。

受精後1日から5日の間で、F3胚に実体顕微鏡観察による形態と、接触刺激に対する応答によるスクリーニング（F2スクリーン）を行った。主に30 ng/mlのTMPで処理された精子由来のF1、26個体から10系統の変異体を単離した。

さらに、F1個体の卵を機能不能の精子で活性化させて単異発生させた半数体のスクリーンからも2系統単離した。得られた変異系統の内訳は次のとおりである。发育縮退（4系統）、小頭小眼（3系統）、不動（2系統）、心室拡張をともしう浮腫（1系統）、短身（1系統）、および視蓋壊死（1系統）。全ての変異体は劣性致死であり、メンデル様式の遺伝を示した。

TMPによる変異法がうまく機能していることを確かめるため、神経系に異常を持つ2系統の変異体（j5とj10）をさらに詳しく解析した。結果をカラー写真として第2図に示す。

別の変異体として、枝分かれ (*edawakare (edwj10)*) 変異体を頭が小さく体の動かない変異体として見つけた。24時間周辺での尻尾への軽い接触に反応しない特徴と一致して、この変異体で最初にみつかった異常は感覚神経と筋肉であった。この *edw* 変異体と野生型の、三叉神経節とローンビード (*Rohon-Beard*) 感覚神経の末梢軸索、及び *CaP* 軸索の異常な進展のカラー写真を第3図に示す。

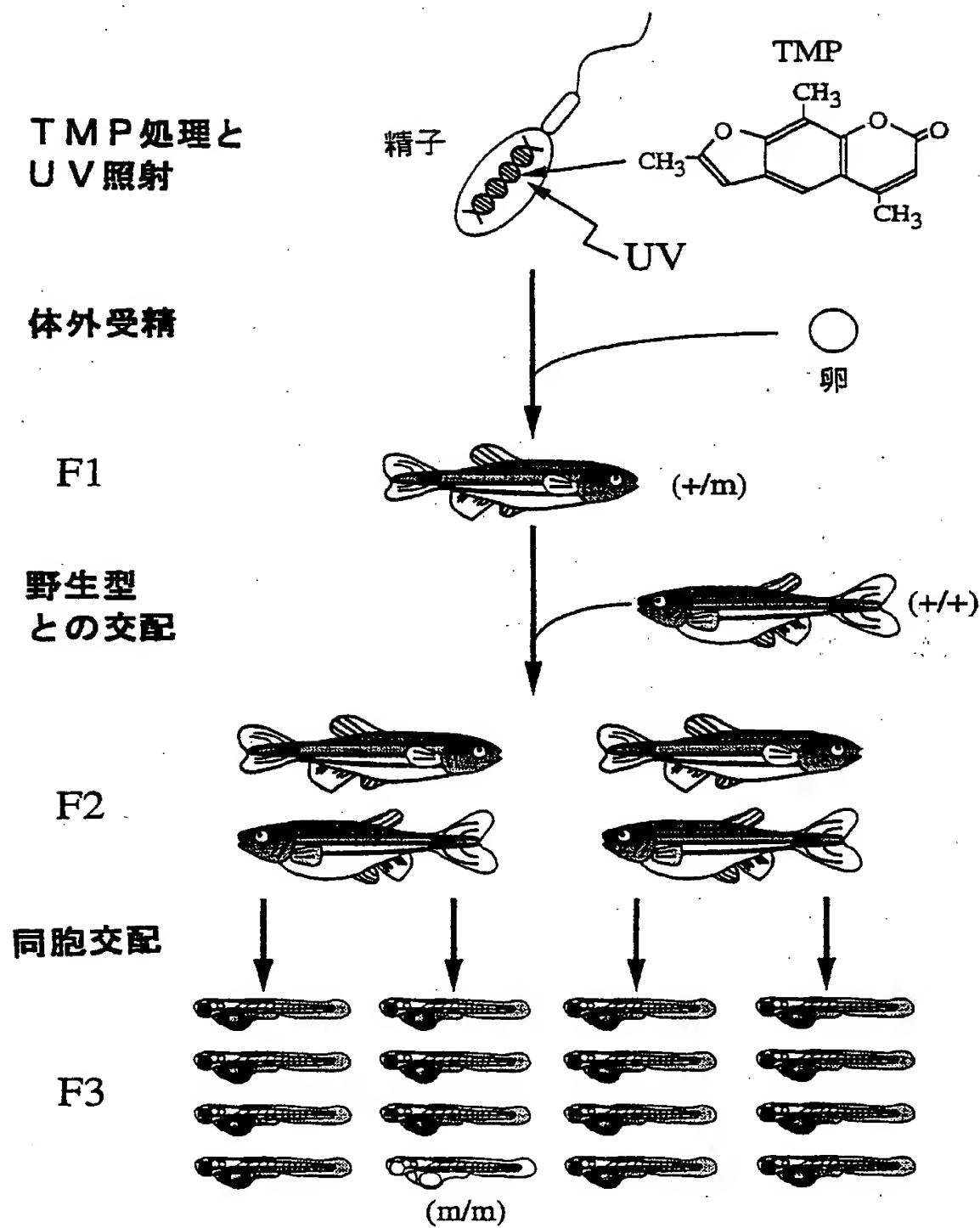
#### 産業上の利用可能性

本発明は、効率の良い脊椎動物、特にゼブラフィッシュ (*zebrafish*) の変異体の作出系を提供するのみならず、染色体に小規模の欠失を誘発するので、正常染色体と比較することで欠失部を目印に、変異遺伝子のクローニングが可能となること、及び、小規模であっても多数のクローニング可能なミュータントを作出できるという特徴を有する方法を提供するものである。

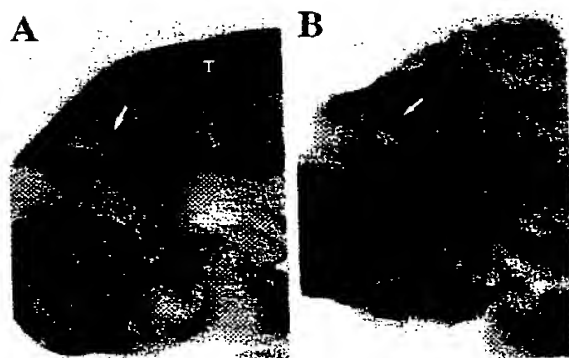
## 請 求 の 範 囲

1. ソラレン誘導体を用いて脊椎動物の遺伝子を変異させる方法。
2. ソラレン誘導体がトリメチルソラレンである請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 脊椎動物がゼブラフィッシュである請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 遺伝子が生殖細胞の遺伝子である請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の方法。
5. 変異させられた部分がピリミジン塩基を含有する部分である請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の方法。
6. 請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の方法のより変異した遺伝子を製造する方法。
7. ソラレン誘導体を用いて遺伝子のピリミジン塩基を含有する部分に変異を生じさせ、当該変異遺伝子を発現させてその相関により、脊椎動物の遺伝子の機能を解析する方法。

## 第 1 図

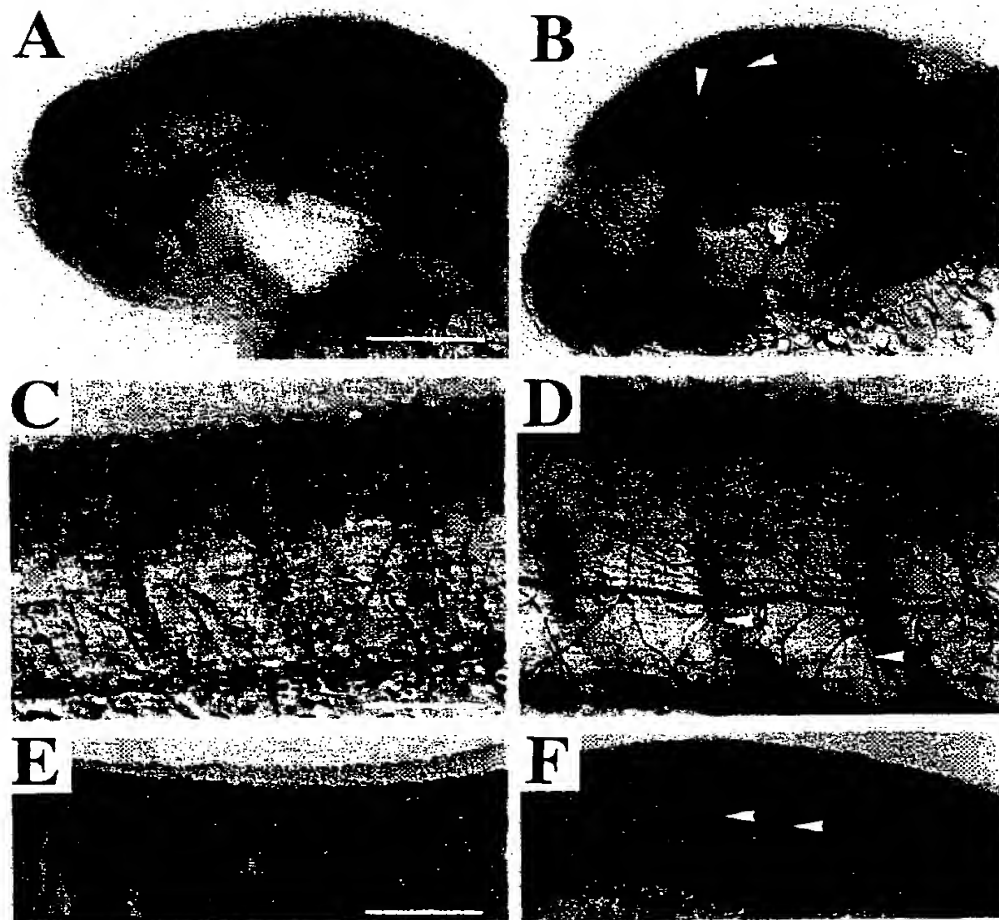


BEST AVAILABLE COPY



BEST AVAILABLE COPY





BEST AVAILABLE COPY